

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-325187
(P2003-325187A)

(43) 公開日 平成15年11月18日 (2003. 11. 18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 39/395	D 2 G 0 4 5
A 6 1 K 39/395			N 4 B 0 2 4
		45/00	4 B 0 6 3
45/00		48/00	4 B 0 6 4
48/00		A 6 1 P 1/00	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 請求項の数39 O L (全 46 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2003-10485 (P2003-10485)

(22) 出願日 平成15年 1 月20日 (2003. 1. 20)

(31) 優先権主張番号 特願2002-12180 (P2002-12180)

(32) 優先日 平成14年 1 月21日 (2002. 1. 21)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願2002-44981 (P2002-44981)

(32) 優先日 平成14年 2 月21日 (2002. 2. 21)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願2002-61668 (P2002-61668)

(32) 優先日 平成14年 3 月 7 日 (2002. 3. 7)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目 1 番 1 号

(72) 発明者 中西 淳

茨城県つくば市花室1557-11

(72) 発明者 森田 滋

カナダ国、オンタリオ州、オタワ、チャペ
ル ストリート 160 アパート 1130

(74) 代理人 100114041

弁理士 高橋 秀一 (外 1 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規タンパク質、そのDNAおよびその用途

(57) 【要約】

【課題】 肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患の予防・治療に有用な、新規タンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、該タンパク質の活性を阻害する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られる化合物などの提供。

【解決手段】 本発明のタンパク質およびポリヌクレオチドは、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患、鼻炎などの診断マーカー等として有用であり、該タンパク質、ポリヌクレオチドまたは抗体を用いるスクリーニングにより得られる阻害剤、該タンパク質の活性を阻害する中和抗体は、例えば、慢性閉塞性肺疾患などの肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患、鼻炎などの予防・治療剤として使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：1 もしくは配列番号：17 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。

【請求項 2】 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。

【請求項 3】 配列番号：17 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。

【請求項 4】 配列番号：19 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。

【請求項 5】 配列番号：19 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。

【請求項 6】 請求項 1 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項 7】 請求項 4 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項 8】 請求項 1 記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

【請求項 9】 請求項 4 記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

【請求項 10】 DNA である請求項 8 または請求項 9 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】 配列番号：2 または配列番号：18 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 12】 配列番号：20 で表される塩基配列を含有する請求項 10 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】 請求項 8 または請求項 9 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 14】 請求項 13 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 15】 請求項 14 記載の形質転換体を培養し、請求項 1 もしくは請求項 4 記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩を生成、蓄積せしめ、これを採用することを特徴とする請求項 1 もしくは請求項 4 記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩の製造法。

【請求項 16】 請求項 1 もしくは請求項 4 記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる医薬。

【請求項 17】 請求項 1 または請求項 4 記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体。

【請求項 18】 請求項 17 記載の抗体を含有してなる医薬。

【請求項 19】 請求項 17 記載の抗体を含有してなる診断薬。

【請求項 20】 請求項 8 または請求項 9 記載のポリヌ

クレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド。

【請求項 21】 請求項 20 記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

【請求項 22】 請求項 1 もしくは請求項 4 記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする、請求項 1 もしくは請求項 4 記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 23】 請求項 1 もしくは請求項 4 記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする、請求項 1 もしくは請求項 4 記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 24】 請求項 22 記載のスクリーニング方法または請求項 23 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項 1 もしくは請求項 4 記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩の活性を阻害する化合物またはその塩。

【請求項 25】 請求項 24 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 26】 請求項 8 または請求項 9 記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項 1 または請求項 4 記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 27】 請求項 8 または請求項 9 記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、請求項 1 または請求項 4 記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 28】 請求項 26 記載のスクリーニング方法または請求項 27 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項 1 または請求項 4 記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩。

【請求項 29】 請求項 28 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 30】 請求項 17 記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 または請求項 4 記載のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 31】 請求項 17 記載の抗体を含有することを特徴とする、請求項 1 または請求項 4 記載のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 32】 請求項 30 記載のスクリーニング方法または請求項 31 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項 1 または請求項 4 記載のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩。

【請求項33】 請求項32記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項34】 呼吸器疾患、鼻炎または消化器疾患の予防・治療剤である請求項16、18、21、25、29または33記載の医薬。

【請求項35】 慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息、炎症性腸疾患または逆流性食道炎の予防・治療剤である請求項34記載の医薬。

【請求項36】 呼吸器疾患、鼻炎または消化器疾患の診断薬である請求項19記載の診断薬。

【請求項37】 慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息、炎症性腸疾患または逆流性食道炎の診断薬である請求項36記載の診断薬。

【請求項38】 哺乳動物に対して、請求項24、請求項28または請求項32記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息、炎症性腸疾患または逆流性食道炎の予防・治療方法。

【請求項39】 慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息、炎症性腸疾患または逆流性食道炎の予防・治療剤を製造するための請求項24、請求項28または請求項32記載の化合物またはその塩の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規タンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該タンパク質の活性を阻害する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られる化合物等に関する。さらに詳しくは、呼吸器疾患、消化器疾患などの予防・治療剤または診断薬として有用な新規タンパク質等に関する。

【0002】

【従来の技術】慢性閉塞性肺疾患（慢性気管支炎、肺気腫）は、喫煙世代の高齢化、平均寿命の延長等にもなっており、今後、呼吸器疾患の中心的な病気になると考えられている。また、気管支喘息は気道の慢性炎症性疾患であり、気道狭窄を示し、発作性の呼吸困難、喘鳴、咳などの症状が見られる。その発症と進展には気道上皮細胞、肥満細胞、好酸球、Tリンパ球などの多くの細胞が関与している。気管支喘息の最も重要な特徴の1つは、気道が刺激に対して反応しやすいこと（気道過敏性）である。この気道過敏性は、好酸球など気道に浸潤した細胞から分泌される化学伝達物質による気道上皮の剥離を中心とする気道の炎症に起因するが、さらに、遺伝因子や環境因子も複雑に影響していると考えられている。外界からの刺激（アレルゲン、排気物）やウイルス感染により気道の炎症反応の引き金がかかると、気道上皮細胞や気管支周辺の毛細血管内皮細胞上にVCAM-1、ICAM-1などの接着分子が発現し〔ジャーナル・オブ・アラジー・アンド・クリニカル・イムノロジー（J.Allergy Clin.Immunol.）、96巻、941頁（1995）〕、サイトカイン

や化学遊走物質が産生される。気管支喘息の患者はTh2型のヘルパーT細胞の機能が亢進しており、IL-3、IL-4、IL-5、IL-13、GM-CSFなどのTh2型のサイトカインやeotaxin、RANTESなどのケモカインの産生が増加する。IL-4やIL-13はIgEの産生誘導作用があり、IL-3やIL-4は肥満細胞の増殖誘導作用がある。さらに、IL-5、GM-CSFなどの作用により好酸球が分化増殖し、eotaxin、RANTESにより気道に浸潤してくる〔アラジー・アンド・アズマ・プロシーディング（Allergy Asthma Proc.）、20巻、141頁（1999）〕。ヒト由来CLCA（Cl-channel, Ca²⁺-activated）4のDNAおよびタンパク質は、カルシウム依存性のクロライドチャネルタンパク質ファミリーに属するものの〔非特許文献1 フェブス・レターズ（FEBS Letters）、455巻、295頁（1999）〕、慢性閉塞性肺疾患（COPD; Chronic Obstructive Pulmonary disease）、気管支喘息との関連は知られていない。一方、ヒトCLCA1遺伝子の塩基配列は、ジェノミクス（Genomics）、54巻、200頁（1998）、バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーションズ（Biochem Biophys Res Commun）、255巻、347頁（1999）などに記載されており、この遺伝子が気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患と関連していることが報告されている（特許文献1 WO 01/38530号公報）。ヒトCLCA1遺伝子の塩基配列と相同性を示すものとして、マウスgob-5遺伝子の塩基配列〔バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーション（Biochem. Biophys. Res. Commun.）、255巻、347頁（1999）〕、ブタCLCA1遺伝子の塩基配列〔フィジオロジカル ゲノミクス（Physiol. Genomics）、3巻、101頁（2000）〕などが知られている。

【0003】

【特許文献1】WO 01/38530号公報

【非特許文献1】フェブス・レターズ（FEBS Letters）、455巻、295頁、1999年

【0004】

【発明が解決しようとする課題】副作用の少ない優れた慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息などの予防・治療剤および診断薬の開発が望まれている。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、カルシウム依存性のクロライドチャネルファミリーに属する新規遺伝子を見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、（1）配列番号：1もしくは配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、（2）配列番号：1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、（3）配列番号：17で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、（4）配列番号：19で表されるアミノ酸配列と同一

もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、(5) 配列番号：19で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

(6) 上記(1)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、(7) 上記(4)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、(8) 上記(1)記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、(9) 上記

(4)記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(10) DNAである上記(8)または(9)記載のポリヌクレオチド、(11) 配列番号：2または配列番号：18で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド、(12) 配列番号：20で表される塩基配列を含有する上記(10)記載のポリヌクレオチド、(13)

上記(8)または(9)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、(14) 上記(13)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、(15)

上記(14)記載の形質転換体を培養し、上記(1)もしくは(4)記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記(1)もしくは(4)記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩の製造法、(16) 上記(1)もしくは(4)記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる医薬、(17) 上記(1)または(4)記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、(18) 上記(17)記載の抗体を含有してなる医薬、(19) 上記(17)記載の抗体を含有してなる診断薬、(20) 上記(8)または

(9)記載のポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド、(21) 上記(20)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬、(22) 上記(1)もしくは(4)記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする、上記(1)もしくは(4)記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(23) 上記(1)もしくは(4)記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする、上記(1)もしくは(4)記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(24) 上記(22)記載のスクリーニング方法または上記(23)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(1)もしくは(4)記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはそれらの塩の活性を阻害する化合物またはその塩、(25) 上記(24)記載の化合物またはその塩を含有してなる医

薬、(26) 上記(8)または(9)記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記(1)または(4)記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(27) 上記

(8)または(9)記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、上記(1)または(4)記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(28) 上記(26)記載のスクリーニング方法または上記(27)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(1)または

(4)記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、(29) 上記(28)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、(30) 上記(1)

(7)記載の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)または(4)記載のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(31) 上記

(17)記載の抗体を含有することを特徴とする、上記(1)または(4)記載のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(3

2) 上記(30)記載のスクリーニング方法または上記(31)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(1)または(4)記載のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩、(33) 上記(3

2)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、(34) 呼吸器疾患、鼻炎または消化器疾患の予防・治療剤である上記(16)、(18)、(21)、(2

5)、(29)または(33)記載の医薬、(35) 慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息、炎症性腸疾患または逆流性食道炎の予防・治療剤である上記(34)記載の医

薬、(36) 呼吸器疾患、鼻炎または消化器疾患の診断薬である上記(19)記載の診断薬、(37) 慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息、炎症性腸疾患または逆流性

食道炎の診断薬である上記(36)記載の診断薬、(38) 哺乳動物に対して、上記(24)、(28)または(32)記載の化合物またはその塩の有効量を投与す

ることを特徴とする慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息、炎症性腸疾患または逆流性食道炎の予防・治療方法、(39) 慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息、炎症性腸疾患または逆流性食道炎の予防・治療剤を製造するための上記

(24)、(28)または(32)記載の化合物またはその塩の使用などを提供する。さらには、(40) タンパク質が、①配列番号：1または配列番号：17で表されるアミノ酸配列、②配列番号：1または配列番号：17で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好

ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が欠

失したアミノ酸配列、③配列番号：1または配列番号：17で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、

さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が付加し

たアミノ酸配列、④配列番号：1または配列番号：17で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、⑤配列番号：1または配列番号：17で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑥これら②～⑤を組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質である上記（1）記載のタンパク質、（41）上記（8）または（9）記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、（42）上記（8）または（9）記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬なども提供する。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明の配列番号：1または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、および配列番号：19で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質と称することもある）は、ヒトや非ヒト温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

【0007】配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上、より好ましくは約97%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番

号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。配列番号：17で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：17で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上、より好ましくは約97%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：17で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：17で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：17で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。配列番号：19で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：19で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上、より好ましくは約97%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。配列番号：19で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：19で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：19で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。実質的に同質の活性としては、例えば、クロライドチャンネル活性（例、カルシウム依存性クロライドチャンネル活性など）などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的にまたは薬理的に）同質であることを示す。したがって、クロライドチャンネル活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。クロライドチャンネル活性などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことが出来、例えば、ジェノミクス（Genomics）、54巻、200頁（1998）に記載の方法またはそれに準じる方法に従って測定することができる。

【0008】また、本発明のタンパク質としては、例えば、（1）①配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好

ましくは 1~10 個程度、さらに好ましくは数 (1~5) 個) のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (好ましくは、1~30 個程度、好ましくは 1~10 個程度、さらに好ましくは数 (1~5) 個) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、(2) ①配列番号: 17 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (好ましくは、1~30 個程度、好ましくは 1~10 個程度、さらに好ましくは数 (1~5) 個) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号: 17 で表されるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上 (好ましくは、1~30 個程度、好ましくは 1~10 個程度、さらに好ましくは数 (1~5) 個) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号: 17 で表されるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上 (好ましくは、1~30 個程度、好ましくは 1~10 個程度、さらに好ましくは数 (1~5) 個) のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号: 17 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (好ましくは、1~30 個程度、好ましくは 1~10 個程度、さらに好ましくは数 (1~5) 個) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、

(3) ①配列番号: 19 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (好ましくは、1~30 個程度、好ましくは 1~10 個程度、さらに好ましくは数 (1~5) 個) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号: 19 で表されるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上 (好ましくは、1~30 個程度、好ましくは 1~10 個程度、さらに好ましくは数 (1~5) 個) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号: 19 で表されるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上 (好ましくは、1~30 個程度、好ましくは 1~10 個程度、さらに好ましくは数 (1~5) 個) のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号: 19 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (好ましくは、1~30 個程度、好ましくは 1~10 個程度、さらに好ましくは数 (1~5) 個) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインなども含まれる。

【0009】本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端が N 末端 (アミノ末端)、右端が C 末端 (カルボキシル末端) である。配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、C 末端が、カルボキシル基 (-COOH)、カルボキシレート (-COO⁻)、アミド (-CONH₂) またはエステル (-COOR) の何れであってもよい。ここでエステルにおける R としては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチ

ルなどの C₁₋₆ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C₃₋₈ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C₆₋₁₂ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂ アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂ アルキル基などの C₇₋₁₄ アラルキル基、ビバロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明のタンパク質が C 末端以外にカルボキシル基 (またはカルボキシレート) を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記した C 末端のエステルなどが用いられる。さらに、本発明のタンパク質には、N 末端のアミノ酸残基 (例、メチオニン残基) のアミノ基が保護基 (例えば、ホルミル基、アセチル基などの C₁₋₆ アルカノイルなどの C₁₋₆ アシル基など) で保護されているもの、生体内で切断されて生成する N 末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基 (例えば -OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など) が適当な保護基 (例えば、ホルミル基、アセチル基などの C₁₋₆ アルカノイル基などの C₁₋₆ アシル基など) で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。本発明のタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号: 17 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号: 19 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

【0010】本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明のタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。例えば、本発明のタンパク質の構成アミノ酸配列のうち 20 個以上、好ましくは 50 個以上、さらに好ましくは 70 個以上、より好ましくは 100 個以上、最も好ましくは 200 個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

【0011】また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (好ましくは、1~10 個程度、さらに好ましくは数 (1~5) 個) のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に 1 または 2 個以上 (好ましくは、1~20 個程度、より好ましくは 1~10 個程度、さらに好ましくは数 (1~5) 個) のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に 1 または 2 個以上 (好ましくは、1~20 個程度、より好ましくは 1~10 個程度、さらに好ましくは数 (1~5) 個) のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (好ましくは、1~10 個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは 1~5 個程度) のアミ

ノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。また、本発明の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基 (-COOH)、カルボキシレート (-COO⁻)、アミド (-CONH₂) またはエステル (-COOR) の何れであってもよい。さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のタンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシル基 (またはカルボキシレート) を有しているもの、N末端のアミノ酸残基 (例、メチオニン残基) のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。本発明の部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。本発明のタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸、有機酸) や塩基 (例、アルカリ金属塩) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、辛酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸) との塩などが用いられる。

【0012】本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせてることにより精製分離することができる。

【0013】本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル) フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル) フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパ

ク質の配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル) カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤 (例えば、HOBT、HOObt) とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBTエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0014】保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃~50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

【0015】原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化 (例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロ

オクチル、2-アダムチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェニルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級(C₁₋₆)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bz₁、Cl₂-Bz₁、2-ニトロベンジル、Br-Z、*t*-ブチルなどが用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0016】原料のカルボキシ基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル[アルコール(例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、*N*-ヒドロキシスクシミド、*N*-ヒドロキシフタルイミド、HOBt)とのエステル]などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタ

ンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0017】原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシ基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド(タンパク質)鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシ基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶液中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシ基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様に、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

【0018】本発明の部分ペプチドまたはそれらの塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①~⑤に記載された方法が挙げられる。

- ①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis)、Interscience Publisher s, New York (1966年)
- ②SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide)、Academic Press, NewYork (1965年)
- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株)(1975年)
- ④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)
- ⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができる。逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【0019】本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明のタンパク質をコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のタンパク質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（すなわち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（すなわち、非コード鎖）であってもよい。本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15 (7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のタンパク質のmRNAを定量することができる。本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より全RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、（1）配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、（2）配列番号：18で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：18で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：17で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、（3）配列番号：20で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：20で表される塩基

配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：19で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上、より好ましくは約97%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。配列番号：18で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：18で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上、より好ましくは約97%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。配列番号：20で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：20で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上、より好ましくは約97%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0020】ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行うことができる。ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

【0021】より具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：17で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：18で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：19で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：20で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・

組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：18または配列番号：20で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号：2、配列番号：18または配列番号：20で表される塩基配列とハイスロインジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を含有するDNAなどが用いられる。配列番号：2、配列番号：18または配列番号：20で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。ハイブリダイゼーションの方法およびハイスロインジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。本発明のタンパク質、部分ペプチド（以下、これらをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モ

レキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

【0022】DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan™-superExpress Km (宝酒造(株))、Mutan™-K (宝酒造(株))等を用いて、ODA-LAPCR法やGapped duplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行うことができる。クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

【0023】本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結

することにより製造することができる。ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

【0024】本発明のプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものであってもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン

（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンが含まれない培地によっても選択できる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MFα・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列な

どがそれぞれ利用できる。

【0025】このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103

[ヌクイレック・アシッツ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221

[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) M1114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シゾサッカロマイセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036, ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) KM71 などが用いられる。昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmene acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻) 細胞と略記)、マウスL細胞、マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞、ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

【0026】エシェリヒア属菌を形質転換するには、例

えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行うことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行うことができる。酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行うことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行うことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行うことができる。このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

【0027】宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で

約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、パークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C.C., ネイチャー (Nature), 195,788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

【0028】上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行うことができる。本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られ

た培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。このようにして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

【0029】このようにして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより測定することができる。本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであつてもよい。本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【0030】〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリン

パ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG (好ましくはPEG1000~PEG6000) が10~80%程度の濃度で添加され、20~40℃、好ましくは30~37℃で1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地で行うことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地 (和光純薬工業 (株)) あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日水製薬 (株)) などをを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行うことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0031】 (b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例え

ば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体 (例、DEAE) による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行うことができる。

【0032】〔ポリクローナル抗体の作製〕本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原 (タンパク質抗原) 自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1~20、好ましくは約1~5の割合でカプルさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2~6週毎に1回ずつ、計約3~10回程度行なわれる。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

【0033】本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA (以下、アンチセンスポリヌクレオチドの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある) の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスポリヌクレオチドとしては、本発明のDNAの塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチドであってもよいが、アンチセンスDNAが好

ましい。本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが好適である。具体的には、配列番号：2、配列番号：18または配列番号：20で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2、配列番号：18または配列番号：20で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド（より好ましくは、配列番号：2、配列番号：18または配列番号：20で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド）などが挙げられる。

【0034】アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオエートなどの化学修飾りん酸残基に置換されているもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできる該遺伝子に対応するアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質関連RNAとの相互作用を介して本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチ

ド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とタンパク質との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される（指令にある）タンパク質のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域または3'端ヘアピンループなどは、好ましい対象領域として選択しうるが、タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

【0035】目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係については、目的核酸が対象領域とハイブリダイズすることができる場合は、その目的核酸は、当該対象領域のポリヌクレオチドに対して「アンチセンス」であるということができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のベアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、DNA：RNAハイブリッドであってもよく、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（例、ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーラージンなど）や糖（例、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修

飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。このような修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、またはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

【0036】本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、RNA、DNAまたは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては、核酸の硫黄誘導体、チオホスフェート誘導体、ポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものなどが挙げられる。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、以下のように設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンスポリヌクレオチドをより安定なものにする、アンチセンスポリヌクレオチドの細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、また、もし毒性があるような場合はアンチセンスポリヌクレオチドの毒性をより小さなものにする。このような修飾は、例えばPharm Tech Japan, 8巻, 247頁または395頁, 1992年, Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993年などで数多く報告されている。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例、ホスホリピド、コレステロールなど）などの疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端または5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端または5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。アンチセンスポリヌクレオチドの阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、または本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べるこ

とができる。

【0037】以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、および本発明のDNAのアンチセンスポリヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドと略記する場合がある）の用途を説明する。本発明のタンパク質は、慢性閉塞性肺疾患や鼻炎において組織特異的に発現が増加するので、疾患マーカーとして利用することができる。よって、本発明のタンパク質は、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎など〕、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）、消化管疾患（例、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、逆流性食道炎など）などにおける早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマーカーとして有用である。本発明のタンパク質をコードする遺伝子（本発明のタンパク質遺伝子）のアンチセンスポリヌクレオチド、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩、本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物もしくはその塩、または本発明のタンパク質に対する抗体を含有する医薬は、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎など〕、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）、消化管疾患（例、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、逆流性食道炎など）などの予防・治療剤として使用することができる。好ましくは呼吸器疾患、消化管疾患などの予防・治療剤である。

【0038】〔1〕疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質および本発明のタンパク質遺伝子は、慢性閉塞性肺疾患や鼻炎において組織特異的に発現が増加し、肺、気道あるいは鼻粘膜における粘液産生促進作用および肺胞壁破壊促進作用を有するので、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（慢性

気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎など）、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）、消化管疾患（例、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、逆流性食道炎など）などの予防・治療剤、好ましくは呼吸器疾患、消化管疾患などの予防・治療剤などの低毒性な医薬として安全に使用できる。

したがって、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用であり、該タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。すなわち、本発明は、

（１）本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性（例、クロライドチャネル活性など）を阻害する化合物またはその塩（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法、（２）本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法、（３）本発明の抗体を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法などを提供する。

【0039】スクリーニング方法の具体例としては、

（i）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をカルシウム賦活剤で活性化した場合と（ii）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物とをカルシウム賦活剤で活性化した場合との比較を行うことを特徴とする阻害剤のスクリーニング方法が挙げられる。上記スクリーニング方法においては、例えば、（i）と（ii）の場合における、本発明のタンパク質のクロライドチャネル活性を測定して、比較する。カルシウム賦活剤は、試験化合物と混合した後に、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞に添加してもよく、また、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞にカルシウム賦活剤を添加した後、試験化合物を添加してもよい。本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物との混合は、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をカルシウム賦活剤で活性化する前または後の何れであってもよく、また本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞に試験化合物とカルシウム賦活剤の混合物を添加してもよい。カルシウム賦活剤としてはイオノマイシン、A23187（カルシマイシン）などが用いられる。本発明のタンパク質のクロライドチャネル活性は、公知の方法、例えば、ジェノミクス（Genomics）、54巻、200頁（1998）に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定すること

ができる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどであればいずれでもよい。

【0040】スクリーニング方法の具体例としては、

（iii）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と（iv）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合における、本発明のタンパク質遺伝子の発現量（具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードするmRNA量）を測定して、比較する。本発明のタンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。本発明のタンパク質遺伝子発現量は、公知の方法、例えば、ノーザンブロッティングやReverse transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR）、リアルタイムPCR解析システム（ABI社製、TaqMan polymerase chain reaction）などの方法あるいはそれに準じる方法にしたがって測定することができる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質のクロライドチャネル活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

【0041】スクリーニング方法の具体例としては、

（v）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と（vi）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合との比較を行う。上記スクリーニング方法においては、本発明の抗体を用いて（v）と（vi）の場合における、本発明のタンパク質の発現量（具体的には、本発明のタンパク質量）を測定（例、発現の検出、発現量の定量など）して、比較する。本発明のタンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれ

に準じる方法に従い測定することができる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。例えば、上記(ii)の場合におけるクロライドチャネル活性を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。例えば、上記(iv)の場合における本発明のタンパク質遺伝子の発現量を、上記(iii)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。例えば、上記(vi)の場合における本発明のタンパク質の発現量を、上記(v)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

【0042】本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドをコードするポリペプチド、本発明の抗体または本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞を含有するものである。本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性（例、クロライドチャネル活性など）、本発明のタンパク質遺伝子の発現、または本発明の蛋白質の発現を阻害する化合物またはその塩である。該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

【0043】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（慢性気管支炎、肺炎腫）、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息、嚢胞性線

維症、過敏性肺炎など）、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）、消化管疾患（例、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、逆流性食道炎など）などに対する予防・治療剤、好ましくは呼吸器疾患、消化管疾患などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

【0044】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、それ自体または適当な医薬として、安全に投与することができる。上記投与に用いられる医薬は、上記化合物またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものであり、経口または非経口投与に適する医薬組成物として提供される。例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

【0045】非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

【0046】上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5~500mg、とりわけ注射剤では5~100mg、その

他の剤形では10~250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。例えば、経鼻投与のための組成物としては、吸入剤、点鼻剤、エアゾール剤などが用いられる。常套手段に従って得られた製剤を、吸入剤として使用する場合は、公知の方法を用いて、粉末吸入剤、吸入用懸濁剤、吸入用溶液またはカプセル状吸入剤とし、用時適当な吸入器を用いて適用することができ、特に粉末吸入剤が好ましく用いられる。粉末吸入剤の平均粒子径としては、特に限定されないが、約0.1~20 μ mが好ましく、特に約1~5 μ mが好ましい。また、粉末吸入剤の粒度としては、特に限定されないが、約25 μ m以上の粒子の量が約5%以下、特に約1%以下であることが好ましい。また、吸入剤を使用する場合、適用の際に使用する器具としては、市販の吸入器を用いても良く、例えば、ベントリン・ロタキャップス (VENTOLIN ROTACAPS; グラクソ社)、スピンヘラー (登録商標、藤沢薬品工業(株))、インタール・スピンキャップス (INTAL SPIN CAPS; フィソソズ社)、アトロベント・アンド・ベロテック・インハレテン (ATROVENT AND BEROTEC INHALETEN; ベーリンガー・インゲルハイム社)、フォラディル (FORADIL; チバ社)、ベントディスク (BENTODISK S; グラクソ社)、パブライザー (登録商標、帝人(株))、ブリカニル・ターブハラー (BRICANYL TURBUHALER; アストラ社)、ミアト・インスフレーター (MIAT INSUFFLATOR) などが挙げられる。投与経路としては、通常、吸入器具を用いて鼻、口などへ直接吸入することが好ましい。

【0047】このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど) に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、慢性閉塞性肺疾患治療の目的で、上記化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人 (体重60kgとして) においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、上記化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、慢性閉塞性肺疾患治療の目的で、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人 (体重60kgとして) に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0048】〔2〕本発明のタンパク質、その部分ペプ

チドまたはその塩の定量

本発明のタンパク質に対する抗体 (以下、本発明の抗体と略記する場合がある) は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および (ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。上記 (ii) の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のC端部に反応する抗体であることが望ましい。また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体 (以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある) を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行うこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')₂、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。

【0049】本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量 (例えば、タンパク質量) に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素 (例、¹²⁵I)、¹³¹I)、

³H)、¹⁴C) など)、蛍光物質 (例、シアニン蛍光色素 (例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7 (アマシャムバイオサイエンス社製) など)、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなど)、酵素 (例、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素など)、発光物質 (例、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなど)、ビオチン、ランタニド元素などが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶

化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

【0050】サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（Ｆ）と、抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用い第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

【0051】イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリー

などが好適に用いられる。これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和４９年発行）、入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和５４年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和５３年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第２版）（医学書院、昭和５７年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第３版）（医学書院、昭和６２年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）などを参照することができる。以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質の濃度の増加が検出された場合、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎など〕、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）、消化管疾患（例、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、逆流性食道炎など）などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

【0052】〔３〕遺伝子診断薬

本発明のＤＮＡは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における

本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス（Genomics）、第5巻、874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）、第86巻、2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎など〕、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）、消化管疾患（例、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、逆流性食道炎など）などの疾病である可能性が高いと診断することができる。

【0053】〔4〕アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のDNAの活性・機能（例、クロライドチャネル活性など）を抑制することができるので、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎など〕、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）、消化管疾患（例、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、逆流性食道炎など）などの予防・治療剤、好ましくは呼吸器疾患、消化管疾患などの予防・治療剤として使用することができる。上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合、公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。例えば、該アンチセンスポリヌクレオチドを用いる場合、該アンチセンスポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入

した後、常套手段に従って、ヒトまたは非ヒト哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に局所投与することもできる。該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、慢性閉塞性肺疾患治療の目的で本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを吸入剤として気管内に局所投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につき該アンチセンスポリヌクレオチドを約0.1～100mg投与する。さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

【0054】本発明は、さらに

- ①本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA、
- ②前記二重鎖RNAを含有してなる医薬、
- ③本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイム、
- ④前記リボザイムを含有してなる医薬を提供する。

これらの二重鎖RNA（RNAi；RNA interference法）、リボザイムなどは、上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の発現を抑制することができ、生体内における本発明のペプチドまたは本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の活性や機能（例、クロライドチャネル活性など）を阻害することができるので、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎など〕、炎症性腸疾患、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）などの予防・治療剤として使用することができる。二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature、411巻、494頁、2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine、7巻、221頁、2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のペプチドをコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のペプチドをコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA

上の切断部位に近接した部分(RNA断片)が挙げられる。上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合は、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

【0055】〔5〕本発明の抗体を含有する医薬本発明のタンパク質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患(慢性気管支炎、肺気腫)、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息、10 嚢胞性線維症、過敏性肺炎など〕、アレルギー性結膜炎、鼻炎(例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など)、消化管疾患(例、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、逆流性食道炎など)などの疾患に対する医薬として使用することができる。本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは非ヒト哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、20 投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の慢性閉塞性肺疾患の治療のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液

に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤(アンプル)、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5~500mg、とりわけ注射剤では5~100mg、その他の剤形では10~250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

【0056】〔6〕本発明のタンパク質を含有する医薬本発明のタンパク質(好ましくは部分ペプチド)は、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患(慢性気管支炎、肺気腫)、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎など〕、アレルギー性結膜炎、鼻炎(例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など)、消化管疾患(例、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、逆流性食道炎など)などの予防・治療剤、好ましくは呼吸器疾患、消化管疾患などの予防・治療剤としても有用である。本発明のタンパク質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。例えば、本発明のタンパク質は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするのである。本発明のタンパク質の投与量は、投与対象、

対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形で通常例えば、患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0057】〔7〕本発明のDNAを有する動物の作出本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。すなわち、本発明は、

（1）本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、

（2）非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（1）記載の動物、

（3）ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記

（2）記載の動物、および

（4）本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含み、哺乳動物において発現しうる組換えベクターなどを提供する。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA導入動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを導入することによって作出することができる。また、該DNA導入方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを導入し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA導入動物を作出することもできる。非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F1系統、BDF1系統、B6D2F1系統、BALB/c系統、ICR系統など）

またはラット（例えば、Wistar, SDなど）などが好ましい。哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

【0058】本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に導入させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを導入させる場合、これと相溶性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA導入哺乳動物を作出することができる。

【0059】本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、入ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンI、ウロプラキンI、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子β、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼβIサブユニット、ジストロフ

イン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミンβ-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）のプロモーター、ヒトおよびニワトリβアクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA導入哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

【0060】その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。該翻訳領域はDNA導入動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞

および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

【0061】本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。また、本発明の外来性正常DNAを導入させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該

DNAを有するように繁殖継代することができる。

【0062】本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。また、本発明の外來異常DNAを導入させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質またはその機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。また、上記2種類の本発明のDNA導入動物のその他の利用可能性として、例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA導入動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析する、またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性についての解析、
- ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- ④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
- ⑤本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

【0063】また、本発明のDNA導入動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA導入細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能

不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA導入動物または本発明の外來性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質に関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

【0064】〔8〕ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。すなわち、本発明は、（1）本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、

（2）該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された上記（1）記載の胚幹細胞、（3）ネオマイシン耐性である上記（1）記載の胚幹細胞、（4）非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（1）記載の胚幹細胞、（5）ゲッ歯動物がマウスである上記（4）記載の胚幹細胞、（6）本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、（7）該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる上記（6）記載の非ヒト哺乳動物、

（8）非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（6）記載の非ヒト哺乳動物、（9）ゲッ歯動物がマウスである上記（8）記載の非ヒト哺乳動物、および（10）上記（7）記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害（好ましくは阻害）する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、あるいは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

【0065】本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明

のノックアウトES細胞と略記する)の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ(β-ガラクトシダーゼ遺伝子)、cat(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子)を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列(例えば、polyA付加シグナルなど)を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖(以下、ターゲッティングベクターと略記する)を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

【0066】また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知なEvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス(C57BL/6とDBA/2とのF₁)を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例

としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

【0067】また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF(1-10000U/ml)存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気)で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5mMEDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mMEDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり(M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー(Nature)第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.)第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschmanら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年)、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

【0068】本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティン

グベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲットベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲットベクター上のDNA配列と、ターゲットベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲットベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。本発明のDNAが不活性化

された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

【0069】〔8a〕本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して予防・治療効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して予防・治療効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して予防・治療効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の予防・治療効果を試験することができる。試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。例えば、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息に対して予防・治療効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物にタバコ煙または抗原曝露処置を行ない、タバコ煙または抗原曝露処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の気道反応性変化などを経時的に測定する。該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して予防・治療効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

【0070】該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基

(例、アルカリ金属など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)の慢性閉塞性肺疾患の患者においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)の慢性閉塞性肺疾患の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg、好ましくは約0.1~20mg、より好ましくは約0.1~10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たり換算した量を投与することができる。

【0071】〔8b〕本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

【0072】本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードす

る物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド(X-gal)のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

【0073】該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸など)や塩基(例、有機酸など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。

【0074】また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を阻害し、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患(慢性気管支炎、肺気腫)、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎など〕、アレルギー性結膜炎、鼻炎(例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壞疽性鼻炎、副鼻腔炎など)、消化管疾患(例、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、逆流性食道炎など)などの予防・治療剤、好ましくは呼吸器疾患、消化管疾患などの予防・治療剤などの医薬として有用である。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。該スクリーニング方法で得

られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の慢性閉塞性肺疾患の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の慢性閉塞性肺疾患の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するものが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0075】一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の慢性閉塞性肺疾患の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例

えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の慢性閉塞性肺疾患の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mg度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパク質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

【0076】本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
R	: アデニン (A) または グアニン (G)
Y	: シトシン (C) または チミン (T)
K	: グアニン (G) または チミン (T)
M	: アデニン (A) または シトシン (C)
S	: グアニン (G) または シトシン (C)
W	: アデニン (A) または チミン (T)
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

【0077】

Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸

【0078】また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基
Ph	: フェニル基
TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
Tos	: p-トルエンスルフォニル
CHO	: ホルミル
Bzl	: ベンジル
Cl ₂ -Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
Bom	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
Boc	: t-ブトキシカルボニル
DNP	: ジニトロフェニル
Trt	: トリチル
Bum	: t-ブトキシメチル
Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
HOObt	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1, 2, 3-ベンゾトリアジン
HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

【0079】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕マウスCLCA4タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するマウスCLCA4タンパク質のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

50 〔配列番号：3〕マウスCLCA4遺伝子5'側の塩基

配列を示す。

〔配列番号：4〕マウスCLCA4遺伝子3'側の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕実施例1および実施例3で用いられたプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕実施例1および実施例4で用いられたプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕実施例1および実施例4で用いられたプライマー3の塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕実施例1および実施例2で用いられたプライマー4の塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕実施例1で用いられたプライマー5の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕実施例1および実施例2で用いられたプライマー6の塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕実施例1で用いられたプライマー7の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕実施例1で用いられたプライマー8の塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕実施例1で用いられたプライマー9の塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕実施例1で用いられたプライマー10の塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕実施例1で用いられたT7 promoter primer (プロモータープライマー)の塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕実施例1で用いられたM13RV primer (プライマー)の塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕マウスCLCA4タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：18〕配列番号：17で表されるアミノ酸配列を有するマウスCLCA4タンパク質のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕ラットCLCA4タンパク質の部分アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：20〕配列番号：19で表される部分アミノ酸配列を有するラットCLCA4タンパク質の部分アミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕実施例3で用いられたプライマー11の塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕実施例5で用いられたプライマー12の塩基配列を示す。

〔配列番号：23〕実施例5で用いられたプライマー13の塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕実施例5で用いられたプライマー14の塩基配列を示す。

〔0080〕後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) TOP10/pCR-BluntII-mCLCA4は、2002年2月12日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産

業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7887として、2002年1月29日から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 (郵便番号532-8686) の財団法人発酵研究所 (IFO) に受託番号IFO 16751として寄託されている。後述の実施例3で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) TOP10/pCR-BluntII-mCLCA4は、2002年3月4日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7934として、2002年2月19日から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 (郵便番号532-8686) の財団法人発酵研究所 (IFO) に受託番号IFO 16764として寄託されている。

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。

実施例 1

マウスCLCA4遺伝子のクローニング

ヒトCLCA4遺伝子の塩基配列 [FEBS Letters, 455巻, 295頁 (1999)]、マウスgob-5遺伝子の塩基配列 [Biochem. Biophys. Res. Commun., 255巻, 347頁 (1999)] を参考にして4種のプライマー [プライマー1 (配列番号：5)、プライマー2 (配列番号：6)、プライマー3 (配列番号：7) およびプライマー4 (配列番号：8)] を設計・合成した。次に、マウス大腸組織からISOGEN (和光純薬社製) を用いて全RNAを調製した。さらにmRNA purification kit (アマシャムファルマシアバイオテク社製) を用いてmRNAを調製した。このmRNA 1μgを出発材料としてMarathon cDNA Amplification kit (Clontech社製) を用いて逆転写反応によりcDNAを合成した。このcDNAを鋳型としてプライマー1とプライマー2、プライマー3とプライマー4の組み合わせでPCRを行った後、アガロース電気泳動により予想される大きさのDNA断片が増幅されることを認めた。反応はpyrobest DNA polymerase (宝酒造社製) を用いてサーマルサイクラーGene Amp PCRSystem 9700 (パーキンエルマー社製) にて、最初94℃で30秒間反応させた後、94℃で10秒、60℃で30秒、72℃で2分30秒を1反応サイクルとして35サイクル繰り返し、最後は72℃で10分間反応させた。得られたDNA断片はpCR-BluntII-TOPO (Invitrogen社製) にクローニングした。さらにT7 promoter primer (配列番号：15)、M13RV primer (配列番号：16) および6種の合成プライマー [プライマー5 (配列番号：9)、プライマー6 (配列番号：10)、プライマー7 (配列番号：11)、プライマー8 (配列番号：12)、プライマー9 (配列番号：13) およびプライマー10 (配列番号：14)] を用いてサイクルシークエンス反応を行い、蛍光DNAシークエンサー377 (パーキンエルマー社製) で得られた反応物の塩基配列を決定した。その結果、マウスCLCA4遺伝子の部分塩基配列とし

てマウスN末端配列を含有する2027個の塩基配列を挿入したクローンNo.3-1(配列番号:3)とマウスC末端配列を含有する1869個の塩基配列を挿入したクローンNo.7-3(配列番号:4)を取得した。両者の重複配列を除き、マウスCLCA4は2772個の塩基配列からなることが判明した(配列番号:2)。配列番号:2で表される塩基配列を基に、924個のアミノ酸配列を決定し(配列番号:1)、マウスCLCA4タンパク質と命名した。つづいてクローンNo.7-3をHindIIIで消化し、1.4KbのマウスCLCA4のC末端領域を含むDNA断片を切り出した。これを同じくHindIIIで消化したクローンNo.3-1のマウスCLCA4のN末端領域を含むベクター配列に連結し、マウスCLCA4完全長配列を含むプラスミドpCR-BluntII-mCLCA4を構築した。このプラスミドを含む形質転換体をエシエリヒア・コリ(Escherichia coli) TOP10/pCR-BluntII-mCLCA4と命名した。マウスCLCA4は、アミノ酸レベルで、ヒトCLCA4と68%の相同性を、マウスgob-5と51%の相同性を有していた。

【0081】実施例2

マウスCLCA4遺伝子産物の組織分布の解析

プライマー4(配列番号:8)およびプライマー6(配列番号:10)を用いて、マウスの各組織(骨髄、眼、リンパ節、平滑筋、卵巣、胸腺、胃、膀胱、心臓、全脳、脾臓、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、精巣、7・11・15・17日目胚、大腸)のcDNA(Mouse MTC panel IおよびMouse MTC panel II:クロンテック社製)を鋳型としてPCRを行った。反応はTakara Ex Taq(宝酒造社製)を用いてサーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9600(アプライドバイオシステムズ社製)にて、最初94℃30秒間おいた後で、94℃で10秒、60℃で30秒、72℃で2分を1反応サイクルとして35サイクル繰り返し、最後は72℃で10分間反応させた。得られた反応産物を2%アガロースゲルにて電気泳動にかけた後、臭化エチジウムで染色して増幅された800bpのバンドを検出した。その結果、マウスCLCA4遺伝子産物(mRNA)は平滑筋、大腸で強い発現が見られ、骨格筋でも発現が見られた。

【0082】実施例3

マウスCLCA4A遺伝子のクローニング

マウスCLCA4遺伝子のクローニングの際、マウスCLCA4とは異なる塩基配列を有するクローンの存在が示唆された。そこで、マウス平滑筋cDNA(Mouse MTC panel II:クロンテック社製)を鋳型として、プライマー1(配列番号:5)とプライマー11(配列番号:21)の組み合わせでPCRを行い、アガロース電気泳動により2.7KbのDNA断片が増幅されることを認めた。反応はpyrobest DNA polymerase(宝酒造社製)を用いてサーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9700(パーキンエルマー社製)にて、最初94℃で30秒間反応させた後、94℃で10秒、60℃で30秒、72℃で5分を1反応サイクルとして35サイクル繰り返し、最後は72℃で10分間反応させた。得られたDN

A断片はpCR-BluntII-TOP0(Invitrogen社製)にクローニングした。さらにT7 promoter primer(配列番号:15)、M13RV primer(配列番号:16)および6種の合成プライマー[プライマー5(配列番号:9)、プライマー6(配列番号:10)、プライマー7(配列番号:11)、プライマー8(配列番号:12)、プライマー9(配列番号:13)およびプライマー10(配列番号:14)]を用いてサイクルシーケンシング反応を行い、蛍光DNAシーケンサー377(パーキンエルマー社製)で得られた反応物の塩基配列を決定した。その結果、マウスCLCA4とアミノ酸レベルで94%、ヒトCLCA4と68%の相同性を示す924個のアミノ酸からなるタンパク質(配列番号:17)がコードされていることが判明し(配列番号:18)、マウスCLCA4Aタンパク質と命名した。上記プラスミドpCR-BluntII-mCLCA4を構築した。このプラスミドpCR-BluntII-TOP0を含む形質転換体をエシエリヒア・コリ(Escherichia coli) TOP10/pCR-BluntII-mCLCA4Aと命名した。

【0083】実施例4

マウスCLCA4A遺伝子産物の組織分布の解析

マウスCLCA4とマウスCLCA4Aの共通配列であるプライマー2(配列番号:6)とプライマー3(配列番号:7)の組み合わせでPCRにより増幅した1020bpのDNA断片が、マウスCLCA4由来は制限酵素PvuII(宝酒造社製)で消化されないのに対し、マウスCLCA4A由来は680bpと340bpに消化されることを利用して、それぞれの組織分布を調べた。PCR反応はTakara Ex Taq(宝酒造社製)を用いてサーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9600(アプライドバイオシステムズ社製)にて、最初94℃30秒間おいた後で、94℃で10秒、60℃で30秒、72℃で2分を1反応サイクルとして35サイクル繰り返すことにより行った。得られた反応産物をPvuIIで消化し、2%アガロースゲルにて電気泳動にかけた後、臭化エチジウムで染色してバンドを検出した。その結果、大腸由来の増幅したDNA断片は消化されなかったが、平滑筋由来の増幅したDNA断片はそのうちの約半量がPvuIIにより消化され、マウスCLCA4遺伝子産物(mRNA)は平滑筋および大腸に発現しているが、マウスCLCA4A遺伝子産物(mRNA)は平滑筋にのみ発現していることが判明した。

【0084】実施例5

ラットCLCA4遺伝子のクローニング

ヒトCLCA4遺伝子の塩基配列(FEBS Letters, 455巻, 295頁, 1999年)、マウスCLCA4遺伝子の塩基配列(配列番号:2)およびマウスCLCA4A遺伝子の塩基配列を参考にして2種のプライマー[プライマー12(配列番号:22)およびプライマー13(配列番号:23)]を設計・合成した。次に、ラット腸組織からISOGEN(和光純薬社製)を用いて全RNAを調製した。さらにmRNA purification kit(アマシャムファルマシアバイオテック社製)を用いてmRNAを調製した。このmRNA 1μgを出発材料とし

てMarathon cDNA Amplification kit (Clontech社製)を用いて逆転写反応によりcDNAを合成した。このcDNAを鋳型としてプライマー12とプライマー13の組み合わせでPCRを行った後、アガロース電気泳動により予想される大きさのDNA断片が増幅されることを認めた。反応はpyrobest DNA polymerase (宝酒造社製)を用いてサーマルサイクラーGene Amp PCR System 9700 (パーキンエルマー社製)にて、最初94℃で30秒間反応させた後、94℃で10秒、60℃で30秒、72℃で2分を1反応サイクルとして35サイクル繰り返し、最後は72℃で10分間反応させた。得られたDNA断片はpCR-BluntII-TOPO (Invitrogen社製)にクローニングした。さらにT7 promoter primer (配列番号: 15)、M13RV primer (配列番号: 16)および3種の合成プライマー〔プライマー12 (配列番号: 22)、プライマー13 (配列番号: 23)、プライマー14 (配列番号: 24)〕を用いてサイクルシーケンス反応を行い、蛍光DNAシーケンサー377 (パーキンエルマー社製)で得られた反応物の塩基配列を決定した。その結果、ラットCLCA4遺伝子の部分塩基配列として1119個の塩基配列を挿入したクローンNo.a-20 (配列番号: 20)を取得した。配列番号: 20で表される塩基配列を基に、373個の部分アミノ酸配列を決定した (配列番号: 19)。該部分アミノ酸配列は、ヒトCLCA4の対応する配列とは66%、マウスCLCA4およびマウスCLCA4Aの対応する配列とは81%の相同性を有していた。

【0085】

【発明の効果】本発明のタンパク質およびポリヌクレオチドは、例えば肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患 (慢性気管支炎、肺気腫)、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎など〕、アレルギー性結膜炎、鼻炎 (例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など)、消化管疾患 (例、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、逆流性食道炎など)などの診断マーカー等として有用であり、該タンパク質、ポリヌクレオチドま

たは該タンパク質に対する抗体を用いるスクリーニングにより得られる阻害剤、該タンパク質の活性を阻害する中和抗体などは、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患 (慢性気管支炎、肺気腫)、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎など〕、アレルギー性結膜炎、鼻炎 (例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など)、消化管疾患 (例、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、逆流性食道炎など)などの予防・治療剤、好ましくは呼吸器疾患、消化管疾患などの予防・治療剤として使用することができる。また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質の発現を抑制することができ、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患 (慢性気管支炎、肺気腫)、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎など〕、アレルギー性結膜炎、鼻炎 (例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など)、消化管疾患 (例、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、逆流性食道炎など)などの疾病の予防・治療剤、好ましくは呼吸器疾患、消化管疾患などの予防・治療剤などとして使用することができる。さらに、本発明の各種のポリヌクレオチドは肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患 (慢性気管支炎、肺気腫)、びまん性汎細気管支炎、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎など〕、アレルギー性結膜炎、鼻炎 (例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など)、消化管疾患 (例、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、逆流性食道炎など)などの診断、予防または治療に有用である。

【0086】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.
 <120> New Protein, DNA and Use thereof
 <130> B03011
 <150> JP 2002-012180
 <151> 2002-01-21
 <150> JP 2002-44981
 <151> 2002-02-21
 <150> JP 2002-61668
 <151> 2002-03-07
 <160> 24
 <210> 1
 <211> 924

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

```

Met Ala Phe Ser Arg Gly Pro Val Phe Leu Leu Leu Leu Tyr Leu
      5              10              15
Leu Trp Gly Ser Asp Thr Ser Leu Ile Arg Leu Asn Glu Asn Gly Tyr
      20              25              30
Glu Asp Ile Ile Ile Ala Ile Asp Pro Ala Val Pro Glu Asp Thr Thr
      35              40              45
Ile Ile Glu His Ile Lys Gly Met Val Thr Lys Ala Ser Thr Tyr Leu
      50              55              60
Phe Glu Ala Thr Glu Lys Arg Phe Phe Phe Lys Asn Val Ser Ile Leu
      65              70              75              80
Ile Pro Glu Ser Trp Lys Asp Ser Pro Gln Tyr Arg Arg Pro Lys Gln
      85              90              95
Glu Ser Tyr Lys His Ala Asp Ile Lys Val Ala Pro Pro Thr Val Glu
      100             105             110
Gly Arg Asp Glu Pro Tyr Thr Arg Gln Phe Thr Gln Cys Glu Glu Lys
      115             120             125
Ala Glu Tyr Ile His Phe Thr Pro Asp Phe Val Leu Gly Arg Lys Gln
      130             135             140
Asp Glu Tyr Gly Asp Ser Gly Lys Val Leu Val His Glu Trp Ala His
      145             150             155             160
Leu Arg Trp Gly Val Phe Asp Glu Tyr Asn Glu Asp Gln Pro Phe Tyr
      165             170             175
Ser Ala Ser Ser Lys Lys Ile Glu Ala Thr Arg Cys Ser Thr Gly Ile
      180             185             190
Thr Gly Thr Asn Arg Val Tyr Ala Cys Gln Gly Gly Ser Cys Ala Met
      195             200             205
Arg Arg Cys Arg Thr Asn Ser Thr Thr Lys Leu Tyr Glu Lys Asp Cys
      210             215             220
Gln Phe Phe Pro Asp Lys Val Gln Ser Glu Lys Ala Ser Ile Met Phe
      225             230             235             240
Met Gln Ser Ile Asp Ser Val Thr Glu Phe Cys Lys Lys Glu Asn His
      245             250             255
Asn Arg Glu Ala Pro Thr Leu His Asn Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ser
      260             265             270
Thr Trp Glu Val Ile Ser Thr Ser Glu Asp Phe Asn Ser Ser Thr Pro
      275             280             285
Met Glu Thr Ser Pro Ser Pro Pro Phe Phe Ser Leu Leu Arg Ile Ser
      290             295             300
Glu Arg Ile Met Cys Leu Val Leu Asp Val Ser Gly Ser Met Thr Ser
      305             310             315             320
Tyr Asp Arg Leu Asn Arg Met Asn Gln Ala Ala Lys Tyr Phe Leu Ser
      325             330             335
Gln Ile Ile Glu Asn Arg Ser Trp Val Gly Met Val His Phe Ser Ser
      340             345             350
Gln Ala Thr Ile Val His Glu Leu Ile Gln Ile Asn Ser Asp Ile Glu
      355             360             365
Arg Asn Gln Leu Leu Gln Thr Leu Pro Thr Ser Ala Asn Gly Gly Thr

```

65

66

370	375	380
Ser Ile Cys Ser Gly Ile Lys Ala Ala Phe Gln Val Phe Lys Asn Gly		
385	390	395
Glu Tyr Gln Thr Asp Gly Thr Glu Ile Leu Leu Leu Ser Asp Gly Glu		400
	405	410
Asp Ser Thr Ala Lys Asp Cys Ile Asp Glu Val Lys Asp Ser Gly Ser		415
	420	425
Ile Val His Phe Ile Ala Leu Gly Pro Ser Ala Asp Leu Ala Val Thr		430
	435	440
Asn Met Ser Ile Leu Thr Gly Gly Asn His Lys Leu Ala Thr Asp Glu		445
	450	455
Ala Gln Asn Asn Gly Leu Ile Asp Ala Phe Gly Ala Leu Ala Ser Glu		460
465	470	475
Asn Ala Asp Ile Thr Gln Lys Ser Leu Gln Leu Glu Ser Lys Gly Ala		480
	485	490
Ile Leu Asn Asn Ser Leu Trp Leu Asn Asp Thr Val Val Ile Asp Ser		495
	500	505
Thr Leu Gly Arg Asp Thr Phe Phe Leu Val Thr Trp Ser Lys Gln Ala		510
	515	520
Pro Ala Ile Tyr Leu Arg Asp Pro Lys Gly Thr Gln Thr Thr Asn Phe		525
	530	535
Thr Met Asp Ser Ala Ser Lys Met Ala Tyr Leu Ser Ile Pro Gly Thr		540
545	550	555
Ala Gln Val Gly Val Trp Thr Tyr Asn Leu Glu Ala Lys Glu Asn Ser		560
	565	570
Glu Ile Leu Thr Ile Thr Val Thr Ser Arg Ala Ala Asn Ser Ser Val		575
	580	585
Pro Pro Ile Thr Val Asn Ala Lys Val Asn Thr Asp Thr Asn Thr Phe		590
	595	600
Pro Ser Pro Met Ile Val Tyr Ala Glu Val Leu Gln Gly Tyr Thr Pro		605
	610	615
Ile Ile Gly Ala Arg Val Thr Ala Thr Ile Glu Ser Asn Ser Gly Lys		620
625	630	635
Thr Glu Glu Leu Val Leu Leu Asp Asn Gly Ala Gly Ala Asp Ala Phe		640
	645	650
Lys Asp Asp Gly Val Tyr Ser Arg Phe Phe Thr Ala Tyr Ser Val Asn		655
	660	665
Gly Arg Tyr Ser Leu Lys Val Arg Ala Asp Gly Gly Arg Asn Ser Ala		670
	675	680
Arg Arg Ser Leu Arg His Pro Ser Ser Arg Ala Ala Tyr Ile Pro Gly		685
	690	695
Trp Val Val Asp Gly Glu Ile Gln Gly Asn Pro Pro Arg Pro Glu Thr		700
705	710	715
Thr Glu Ala Thr Gln Pro Val Leu Glu Asp Phe Ser Arg Thr Ala Ser		720
	725	730
Gly Gly Ala Phe Val Met Ser Asn Val Pro Ile Gly Pro Leu Pro Asp		735
	740	745
Val Tyr Pro Pro Asn Arg Ile Thr Asp Leu Gln Ala Thr Leu Asp Gly		750
	755	760
Glu Glu Ile Ser Leu Thr Trp Thr Ala Pro Gly Asp Asp Tyr Asp Val		765

67

68

770	775	780
Gly Arg Val Gln Gln Tyr Ile Ile Arg Thr Ser Lys Asn Ile Ile Glu		
785	790	795
Leu Arg Asp Asn Phe Asn Asn Ser Pro Arg Val Asp Thr Thr Asn Leu		
805	810	815
Thr Pro Lys Glu Ala Asn Ser Glu Glu Thr Phe Ala Phe Lys Pro Glu		
820	825	830
Asn Ile Thr Glu Glu Asn Ala Thr Tyr Ile Phe Ile Ala Ile Glu Ser		
835	840	845
Val Asp Lys Ser Ser Leu Ser Ser Gly Pro Ser Asn Ile Ala Gln Val		
850	855	860
Ala Leu Phe Thr Pro Gln Ala Glu Pro Asp Pro Asp Glu Ser Pro Ser		
865	870	875
Leu Ser Gly Val Ser Val Ala Thr Ile Val Leu Ser Val Leu Gly Ala		
885	890	895
Leu Val Leu Val Cys Ile Ile Val Gly Thr Thr Ile Cys Ile Leu Lys		
900	905	910
Asn Lys Arg Ser Ser Ser Ala Ala Ile Thr Lys Phe		
915	920	

<210> 2

<211> 2772

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 2

atggctttct ccagagggcc tgttttcctc ctctctctcc tgtacctgct ttgggggtca	60
gacatttctt tgataaggct gaatgagaat gggtatgaag acatcattat tgccattgat	120
cctgtgtgtc cagaagatac aacaataatt gaacacataa agggaaatgg gactaaagca	180
tctacatacc tttttgaagc tacagaaaaa agatttttct tcaaaaatgt atctatatta	240
attcctgaga gttggaaaaga cagtccccag tacaggaggc caaaacagga gaggtaacag	300
catgttgaca ttaaagtggc acctcccacc gttgagggca gagatgagcc ctacaccagg	360
caattcacac agtgtgaaga gaaagcagaa tacatccact tcacccctga ctttgactg	420
gggagaaaac aagatgaata tggagattca ggaaaagtgt tgggtccatga atgggcccac	480
cttcgctggg gagtatttga tgaatacaat gaagaccagc cattctacag cgcttcatca	540
aagaaaatcg aagcaacaag gtgctccaca ggtatcacgg ggacgaatag agtctatgca	600
tgccaagggg gcagctgtgc gatgagaagg tgcagaacta attccaccac aaagtatat	660
gaaaaggatt gtcaatttct ccctgataaa gttcaatcag aaaaggcttc cataatgttc	720
atgcaaaagta tcgattctgt gactgaattc tgtaaaaagg aaaaccataa tcgagaggct	780
ccaactctac ataataaaaa gtgcaattac agaagcactt gggaagtaat cagcacttct	840
gaggatttta acagcagcac gcccatggag acgtcaccct ctccaccctt cttctccctg	900
ctgaggatca gtgagagaat tatgtgccta gttcttgatg tgtctgggag tatgacttct	960
tatgatcgcc tgaatcgaat gaaccaagca gcaaaatact ttctaagcca gataattgaa	1020
aataggtcct gggtagggat ggtgcacttt agtagccagg ccactattgt gcatgagctg	1080
atccaaataa acagtgcacat cgagagaaac cagctcttgc aaaccttacc tacaagtgcc	1140
aatggaggga cgtccatctg ctctggaatc aaggctgcat ttcaggtatt taaaaatgga	1200
gaataccaaa cagatgggac tgagatcttg ctgttgagtg atggtgagga cagcacagcc	1260
aaagactgta ttgatgaggt gaaagacagc ggggccatag ttcatttcat tgccttggga	1320
ccatcggctg acttagctgt aacaaacatg agcattttaa caggtggaaa ccataagctt	1380
gctacagatg aagcccagaa caatggactc attgatgctt tcggggccct ggcttcagaa	1440
aatgctgata tcaccagaa gtcacttcag cttgaaagta aggggtgcat actgaacaat	1500
agcctctggc tgaatgacac tgttgtaatt gacagcacct tgggaaggga cacattcttt	1560

cttgtcacct ggagcaaaaca agcccctgcc atttatctca gggatcccaa aggaacacaa 1620
 accaccaatt tcacaatgga ctctgcttcc aaaatggcct atctcagtat tccaggaaca 1680
 gctcagggtgg gtgtttggac ttacaacctg gaagccaaag aaaactcaga gatactaacg 1740
 attacagtaa cctctcgggc agcaaattct tctgtgccac caatcactgt aaatgctaag 1800
 gtaaacacgg acactaacac tttccccagc ccaatgattg tgtatgctga agttctacaa 1860
 ggttacactc ccatcattgg agcccagtg acagccacca tagaatctaa cagtgggaag 1920
 acagaagagc tagtccttct ggacaacggt gcaggggctg atgctttcaa ggatgatggg 1980
 gtctactcca ggttcttcac agcttattca gtgaatggca ggtatagctt aaaagtccgt 2040
 gcagatggag gaagaaattc tgcgaggagg agtttacgcc acccatcaag cagagctgca 2100
 tacataccag gctgggtagt agatggagaa attcaaggga acccaccag acccgaaacg 2160
 actgaggcta ctacagccagt cttggaggat ttcagcagga cagcatctgg aggtgccttt 2220
 gtgatgtcca atgttccaat tgggccattg cctgatgtat acccaccaaa tcgaatcaca 2280
 gacctccagg ccacactcga tggggaagag atcagtctaa catggacggc cccaggagat 2340
 gattatgatg ttggaagagt tcaacagtat atcataagaa caagcaaaaa catcattgaa 2400
 ctgagagaca attttaataa ctctcctcgg gttgatacaa ctaaccttac accaaaagaa 2460
 gccaaactcg aggaaacctt tgcctttaa ccagaaaata tcacagaaga aaatgcaacg 2520
 tacatattca ttgccattga aagtgtcgac aaaagcagtt tgagtctggg accatccaac 2580
 atgcacaag tggcactgtt caccctcag gcagagcctg accctgatga aagtccaagt 2640
 ttatcaggag ttagtgttgc tactattgtg ctgtctgttt tgggcgctct tgttctagtt 2700
 tgtattattg taggtaccac aatttgtatc ttaaagaaca aaaggctctc atcagcagct 2760
 ataacaaaat tt 2772

<210> 3

<211> 2027

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 3

gaatgatggc tttctccaga gggcctgtt tcctcctcct cctcctgtac ctgctttggg 60
 ggtcagacac ttccttgata aggctgaatg agaatggta tgaagacatc attattgcca 120
 ttgatcctgc tgtgccagaa gatacaacaa taattgaaca cataaaggga atggtgacta 180
 aagcatctac ataccttttt gaagctacag aaaaaagatt tttcttcaaa aatgtatcta 240
 tattaattcc tgagagtgg aaagacagtc ccagtacag gaggccaaaa caggagagtt 300
 acaagcatgc tgacattaaa gtggcacctc ccaccgttga gggcagagat gagccctaca 360
 ccaggcaatt cacacagtgt gaagagaaag cagaatacat ccacttcacc cctgactttg 420
 tactggggag aaaacaagat gaatatggag attcagggaa agtgttggc catgaatggg 480
 cccaccttcg ctggggagta tttgatgaat acaatgaaga ccagccattc tacagcgtt 540
 catcaaagaa aatcgaagca acaagggtct ccacaggat cacggggacg aatagagtct 600
 atgcatgcc aagggggcagc tgtgcgatga gaagggtcag aactaattcc accacaaagt 660
 tatatgaaaa ggattgtcaa ttcttccctg ataaagtcca atcagaaaag gcttcataa 720
 tgttcagca aagtatcgat tctgtgactg aattctgtaa aaaggaaaac cataatcgag 780
 aggctccaac tctacataat aaaaagtgca attacagaag cacttgggaa gtaatcgca 840
 cttctgagga ttttaacagc agcacgccca tggagacgtc accctctcca cccttcttct 900
 ccctgctgag gatcagtgag agaattatgt gcctagtctt tgatgtgtct gggagtatga 960
 cttcttatga tcgcctgaat cgaatgaacc aagcagcaaa atactttcta agccagataa 1020
 ttgaaaatag gtcttgggta gggatgggtc acttttagtag ccaggccact attgtgcatg 1080
 agctgatcca aataaacagt gacatcgaga gaaaccagct cttgcaaac ttacctacaa 1140
 gtgccaatgg agggacgtcc atctgctctg gaatcaaggc tgcatttcag gtatttaaaa 1200
 atggagaata ccaaacagat gggactgaga tcttgctgtt gagtgatggg gaggacagca 1260
 cagccaaaga ctgtattgat gaggtgaaag acagcgggtc catagtcat ttcattgcct 1320
 tgggaccatc ggctgactta gctgtaacaa acatgagcat ttaaacaggt ggaaaccata 1380
 agcttgctac agatgaagcc cagaacaatg gactcattga tgctttcggg gccctggcct 1440

71

72

cagaaaaatgc tgatatcacc cagaagtcac ttcagcttga aagtaagggt gccatactga 1500
 acaatagcct ctggctgaat gacactgttg taattgacag cacccttgga agggacacat 1560
 tctttcttgt caccctggagc aaacaagccc ctgccattta tctcagggat cccaaaggaa 1620
 cacaaaccac caatttcaca atggactctg cttccaaaat ggcttatctc agtattccag 1680
 gaacagctca ggtgggtgtt tggacttaca acctggaagc caaagaaaac tcagagatac 1740
 taacgattac agtaacctct cgggcagcaa attcttctgt gccaccaatc actgtaaatg 1800
 ctaaggtaaa cacggacact aacactttcc ccagcccaat gattgtgtat gctgaagttc 1860
 tacaaggtta cactcccatc attggagccc gagtgacagc caccatagaa tctaacagtg 1920
 ggaagacaga agagctagtc cttctggaca acggtgacag ggctgatgct ttcaaggatg 1980
 atggggtcta ctccagggtc ttcacagctt attcagttaa tggcagg 2027

<210> 4

<211> 1869

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 4

ctaagccaga taattgaaaa taggtcctgg gtagggatgg tgcactttag tagccaggcc 60
 actattgtgc atgagctgat ccaaataaac agtgacatcg agagaaacca gctcttgcaa 120
 accttaccta caagtgccaa tggaggagc tccatctgct ctggaatcaa ggctgcattt 180
 caggatatta aaaatggaga ataccaaca gatgggactg agatcttgct gttgagtgat 240
 ggtgaggaca gcacagccaa agactgtatt gatgaggatg aagacagcgg gtccatagtt 300
 catttcattg ccttgggacc atcggctgac ttagctgtaa caaacatgag cattttaaca 360
 ggtggaaacc ataagcttgc tacagatgaa gccagaaca atggactcat tgatgctttc 420
 ggggcccctgg cttcagaaaa tgctgatatc acccagaagt cacttcagct tgaagtaag 480
 ggtgccatag tgaacaatag cctctggctg aatgacactg ttgtaattga cagcaccttg 540
 ggaagggaca cattctttct tgcacctgg agcaacaag cccctgccat ttatctcagg 600
 gatcccaag gaacacaaac caccaatttc acaatggact ctgcttccaa aatggcctat 660
 ctcatgtatc caggaaacagc tcagggtgggt gtttggactt acaacctgga agccaaagaa 720
 aactcagaga tactaacgat tacagtaacc tctcgggcag caaattcttc tgtgccacca 780
 atcactgtaa atgctaagg aaacacggac actaacactt tccccagccc aatgattgtg 840
 tatgtgaag ttctacaagg ttacactccc atcattggag cccgagtgc agccaccata 900
 gaatctaaca gtgggaagac agaagagcta gtcttctgg acaacgggtc aggggctgat 960
 gctttcaagg atgatgggt ctactccagg ttcttcacag cttattcagt gaatggcagg 1020
 tatagcttaa aagtcctgac agatggagga agaaattctg cgaggaggag tttacgccac 1080
 ccataagca gagctgcata cataccaggc tgggtagtag atggagaaat tcaagggaac 1140
 ccaccagac ccgaaacgac tgaaggctact cagccagtct tggaggattt cagcaggaca 1200
 gcacttgag gtgcctttgt gatgtccaat gttccaattg gtccattgcc tgatgtatac 1260
 ccaccaaacc gaatcacaga cctccaggcc aactcagat gggaagagat cagtctaaca 1320
 tggacggccc caggagatga ttatgatgtt ggaagagttc aacagtatat cataagaaca 1380
 agcaaaaaca tcattgaact gagagacaat tttaataact ctctcgggt tgatacaact 1440
 aaccttacac caaaagaagc caactccgag gaaacctttg cttttaaac agaaaaatc 1500
 acagaagaaa atgcaacgta catattcatt gccattgaaa gtgtcgacaa aagcagtttg 1560
 agttcgggac catcaacat cgacaagtg gcaactgtca cccctcaggc agagcctgac 1620
 cctgatgaaa gtccaagttt atcaggagtt agtggtgcta ctattgtgt gtctgttttg 1680
 ggcgtcttg ttctagtgtt tattattgta ggtaccacaa tttgtatctt aaagaacaaa 1740
 aggtcctcat cagcagctat acaaaaattt tgaaagataa catgaataaa aaagatattt 1800
 ttgagttttt aaagcatatc catgtcatc atgaactcaa aagtaacttc aagagggtct 1860
 aaaagatac 1869

<210> 5

<211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 5
 gaatgatggc tttctccag 19
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 6
 cctgccattc actgaataag 20
 <210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 7
 ctaagccaga taattgaaaa tag 23
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 8
 gtatctttta gaccctcttg 20
 <210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 9
 ctattttcaa ttatctggct tag 23
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 10
 cacagcttat tcagtgaatg 20
 <210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

75

76

<220>

<223> Primer

<400> 11

aagcccagaa caatggac 18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 12

cgaatcacag acctccag 18

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 13

gaactaattc caccacaaag 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 14

agggtacact cctatcattg 20

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 15

aatacgactc actataggg 19

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 16

caggaaacag ctatgac 17

<210> 17

<211> 924

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 17

Met Ala Phe Ser Arg Gly Pro Val Phe Leu Leu Phe Leu Leu Tyr Leu

5 10 15
 Leu Trp Gly Ser Asp Thr Ser Leu Ile Lys Leu Asn Gly Asn Gly Tyr
 20 25 30
 Glu Asp Ile Ile Ile Ala Ile Asp Pro Ala Val Pro Glu Asp Thr Thr
 35 40 45
 Ile Ile Glu His Ile Lys Gly Met Val Thr Lys Ala Ser Thr Tyr Leu
 50 55 60
 Phe Glu Ala Thr Glu Lys Arg Phe Phe Phe Lys Asn Val Ser Ile Leu
 65 70 75 80
 Ile Pro Glu Ser Trp Lys Asn Ser Ser Gln Tyr Arg Arg Pro Lys Gln
 85 90 95
 Glu Ser Tyr Lys His Ala Asp Ile Lys Val Ala Pro Pro Ala Phe Glu
 100 105 110
 Gly Arg Asp Glu Pro Tyr Thr Arg Gln Phe Thr Gln Cys Glu Glu Lys
 115 120 125
 Ala Glu Tyr Ile His Phe Thr Pro Asp Phe Val Leu Gly Arg Lys Gln
 130 135 140
 Val Glu Tyr Gly Asp Ser Gly Lys Leu Leu Val His Glu Trp Ala His
 145 150 155 160
 Leu Arg Trp Gly Val Phe Asp Glu Tyr Asn Glu Asp Gln Pro Phe Tyr
 165 170 175
 Ser Ala Ser Ser Lys Lys Ile Glu Ala Thr Arg Cys Ser Thr Gly Ile
 180 185 190
 Thr Gly Met Asn Arg Val His Thr Cys Gln Gly Gly Ser Cys Ile Thr
 195 200 205
 Arg Arg Cys Arg Thr Asn Ser Thr Thr Lys Leu Tyr Glu Lys Asp Cys
 210 215 220
 Gln Phe Phe Pro Asp Lys Val Gln Ser Glu Lys Ala Ser Ile Met Phe
 225 230 235 240
 Met Gln Ser Ile Asp Ser Val Thr Glu Phe Cys Lys Lys Glu Asn His
 245 250 255
 Asn Arg Glu Ala Pro Thr Leu His Asn Glu Lys Cys Gln Trp Arg Ser
 260 265 270
 Thr Trp Glu Val Ile Ser Ser Ser Glu Asp Phe Asn Ser Ser Thr Pro
 275 280 285
 Met Glu Thr Pro Pro Ala Pro Pro Phe Phe Ser Leu Leu Arg Ile Ser
 290 295 300
 Glu Arg Ile Val Cys Leu Val Leu Asp Val Ser Gly Ser Met Ser Ser
 305 310 315 320
 Ser Asp Arg Leu Asn Arg Met Asn Gln Ala Ala Lys Tyr Phe Leu Ser
 325 330 335
 Gln Ile Ile Glu Asn Arg Ser Trp Val Gly Met Val His Phe Ser Ser
 340 345 350
 Gln Ala Thr Ile Val His Glu Leu Ile Gln Met Asn Ser Asp Ile Glu
 355 360 365
 Arg Asn Lys Leu Leu Gln Thr Leu Pro Thr Ser Ala Ile Gly Gly Thr
 370 375 380
 Ser Ile Cys Ser Gly Ile Lys Thr Ala Phe Gln Val Phe Lys Asn Gly
 385 390 395 400
 Glu Tyr Gln Thr Asp Gly Thr Glu Ile Leu Leu Leu Ser Asp Gly Glu

	405	410	415
Asp Ser Thr	Ala Lys Asp Cys Ile	Asp Glu Val Lys Asp Ser Gly Ser	
	420	425	430
Ile Val His Phe Ile	Ala Leu Gly Pro Ser Ala Asp Leu Ala Val Thr		
	435	440	445
Asn Met Ser Ile Leu Thr	Gly Gly Asn His Lys Leu Ala Thr Asp Glu		
	450	455	460
Ala Gln Asn Asn Gly Leu Ile	Asp Ala Phe Gly Ala Leu Ala Ser Glu		
465	470	475	480
Asn Thr Asp Ile Thr Gln Lys Ser Leu Gln Leu Glu Ser Lys Gly Ala			
	485	490	495
Ile Leu Asn Asn Ser Leu Trp Leu Asn Asp Thr Val Val Ile Asp Ser			
	500	505	510
Thr Val Gly Arg Asp Thr Phe Phe Leu Val Thr Trp Ser Lys Gln Ala			
	515	520	525
Pro Ala Ile Tyr Leu Arg Asp Pro Lys Gly Thr Gln Thr Thr Asn Phe			
	530	535	540
Thr Met Asp Phe Val Ser Lys Met Ala Tyr Leu Ser Ile Pro Gly Thr			
545	550	555	560
Ala Glu Val Gly Val Trp Thr Tyr Asn Leu Glu Ala Lys Glu Asn Ser			
	565	570	575
Glu Ile Leu Thr Ile Thr Val Thr Ser Arg Ala Ala Asn Ser Ser Val			
	580	585	590
Pro Pro Ile Ser Val Asn Ala Lys Val Asn Thr Asp Thr Asn Thr Phe			
	595	600	605
Pro Ser Pro Met Ile Val Tyr Ala Glu Val Leu Gln Gly Tyr Thr Pro			
	610	615	620
Ile Ile Gly Ala Arg Val Thr Ala Thr Ile Glu Ser Asn Ser Gly Lys			
625	630	635	640
Thr Glu Glu Leu Val Leu Leu Asp Asn Gly Ala Gly Ala Asp Ala Phe			
	645	650	655
Lys Asp Asp Gly Val Tyr Ser Arg Phe Phe Thr Ala Tyr Ser Val Asn			
	660	665	670
Gly Arg Tyr Ser Leu Lys Val Arg Ala Asp Gly Gly Thr Asn Ser Ala			
	675	680	685
Arg Arg Ser Leu Arg His Pro Ser Ser Arg Ala Ala Tyr Ile Pro Gly			
	690	695	700
Trp Val Val Asp Gly Glu Ile Gln Gly Asn Pro Pro Arg Pro Glu Met			
705	710	715	720
Thr Glu Ala Thr Gln Pro Val Leu Glu Asn Phe Ser Arg Thr Ala Ser			
	725	730	735
Gly Gly Ala Phe Val Met Ser Asn Val Pro Ile Gly Pro Leu Pro Asp			
	740	745	750
Gln Tyr Pro Pro Asn Arg Ile Thr Asp Leu Gln Ala Thr Leu Asp Gly			
	755	760	765
Glu Glu Ile Ser Leu Thr Trp Thr Ala Pro Gly Asp Asp Tyr Asp Val			
	770	775	780
Gly Arg Val Gln Gln Tyr Ile Ile Arg Thr Ser Glu Asn Ile Ile Asp			
785	790	795	800
Leu Arg Asp Asn Phe Asn Asn Ser Leu Arg Val Asp Thr Thr Lys Leu			

81

82

805 810 815
 Thr Pro Lys Glu Ala Asn Ser Lys Glu Thr Phe Ala Phe Lys Pro Glu
 820 825 830
 Asn Ile Ser Glu Glu Asn Ala Thr Tyr Ile Phe Ile Ala Ile Glu Ser
 835 840 845
 Val Asp Lys Asn Asn Leu Ser Ser Gly Pro Ser Asn Ile Ala Gln Val
 850 855 860
 Ala Met Phe Thr Pro Gln Ala Glu Pro Val Pro Asp Glu Ser Pro Arg
 865 870 875 880
 Ser Ser Gly Val Ser Ile Ser Thr Ile Val Leu Ser Val Val Gly Ser
 885 890 895
 Val Val Leu Val Cys Ile Ile Val Ser Thr Thr Ile Cys Ile Leu Lys
 900 905 910
 Asn Lys Arg Ser Ser Ser Gly Ala Ala Thr Thr Phe
 915 920

<210> 18

<211> 2772

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 18

atggctttct ccagagggcc tgttttcctc ctcttcctct tgtacctgct ttgggggtca 60
 gacacttcct tgataaagct gaatgggaat ggttatgaag acatcattat tgccattgat 120
 cctgctgtgc cagaagatac aacaataatt gaacacataa aggggaatgg gactaaagca 180
 tctacatacc tttttgaagc tacagaaaaa agatttttct tcaaaaatgt gtctatatta 240
 attcctgaga gttggaaaaa cagttccagc tacagaaggc caaacacagga gagttacaag 300
 catgctgaca ttaaagtggc acctcccgcc ttcgagggca gagatgagcc ctacaccagg 360
 cagttcacac agtgtgaaga gaaagcagaa tacattcaact tcaccctga ctttgtactg 420
 gggagaaaac aagttgaata tggagattca ggaaaactgt tgggtccatga atgggccac 480
 cttcgctggg gagtatttga tgagtacaac gaagaccagc cattctacag tgcttcatca 540
 aagaaaatcg aagcaacaag gtgtccaca ggtatcacgg gtatgaatag agtccataca 600
 tgccaagggg gcagctgtat aaccagaagg tgcagaacta attccaccac aaagttatat 660
 gaaaaggatt gtcagttctt cccagataaa gttcaatcag aaaaggcatc cataatgttc 720
 atgcaaagta tcgattctgt gactgagttc tgtaaaaaag aaaaccataa tcgagaggct 780
 ccaactctac ataatgaaaa gtgccaatgg agaagcactt gggaagtaat cagcagttct 840
 gaggtattta acagcagcac gcccattggg acaccaccgg ctccaccctt ctctccctg 900
 ctgaggatca gtgagagaat tgtgtgccta gttcttgatg tgtcaggag tatgagttct 960
 tctgaccgtc tgaatagaat gaaccaagca gcaaaatact ttctaagcca gataattgaa 1020
 aataggtcct gggtagggat ggtgcacttt agtagccagg ccactattgt gcatgagctg 1080
 atccaaatga acagtgcacat cgagagaaac aagctcttgc aaactttacc tacaagtgcc 1140
 attggaggga cgtccatctg ctctggaatc aagactgcat ttcagggtatt taaaaatgga 1200
 gaataccaaa cagatgggac tgagatcttg ctgttgagtg atggggagga cagcacagcc 1260
 aaagactgta ttgacgaggt gaaagacagc ggggtccatag ttcatttcat tgccttggga 1320
 ccacggctg acttagctgt aacaacatg agcattttaa cagggtggaaa ccataagctt 1380
 gctacagatg aagcccagaa caatggactc attgatgctt tcggggccct ggcttcagaa 1440
 aatactgata tcaccagaa gtcacttcag cttgaaagta aggggtccat actgaataat 1500
 agcctctggc tgaatgacac tgttgtaatt gacagcaccg tgggaaggga cacattcttt 1560
 cttgtcacct ggagcaaaca agcccctgcc atttatctca gggatcccaa aggaacacaa 1620
 accaccaatt tcacaatgga ctttgtttcc aaaatggcct atctcagtat ccaggaaca 1680
 gctgaggtgg gcgtttggac ttacaacctg gaagccaaag aaaactcaga gatactaaca 1740
 attacagtaa cctctcgggc agcaaattct tctgtgccac caatctctgt aaatgctaag 1800

83

84

gtaaacacgg acactaacac tttccccagc ccaatgattg tgtatgctga agttctacaa 1860
 gggtagactc ctatcattgg agcccagtg acagccacca tagaatctaa cagtgggaag 1920
 acagaagagc tagtcctgct ggacaacggt gcaggggctg atgctttcaa ggatgatggg 1980
 gtctactcca ggttcttcac agcttattca gtgaatggca ggtatagctt aaaagtcctg 2040
 gcagatggag gaacaaactc tgccaggagg agtttacgcc acccatcaag cagagctgca 2100
 tacataccag gctgggtagt agatggagaa attcaaggga acccaccag acccgaaatg 2160
 actgaggcta ctcagccagt cctagagaat ttcagcagga cagcatctgg aggtgccttt 2220
 gtgatgtcca atgttccaat tgggccattg cctgatcagt acccaccaaa tcgaatcaca 2280
 gacctccagg ccacactcga tggggaagag atcagtctaa catggacggc cccaggagat 2340
 gattatgatg ttggaagagt tcaacagtat atcataagaa caagcgaaaa tatcattgat 2400
 ctcagagaca attttaataa ttctcttcgg gttgatacta ctaaacttac accaaaagaa 2460
 gccaaactcca aagaaacctt tgcctttaa ccagaaaata tctcagaaga aaatgcaacc 2520
 tacatattca ttgccattga aagtgtcgac aaaaacaatt tgagttcggg accatccaac 2580
 atcgcacaa gggcaatgtt caccctcag gcagagcctg tccctgatga aagtccacgt 2640
 tcatcaggag ttagtatttc tactattgtg ctgtctgtgg tgggctctgt tgtactagtt 2700
 tgtattattg taagtaccac tatttgtatc ttaaagaaca aaagtcctc atcaggagct 2760
 gcaacaacat tt 2772

<210> 19

<211> 373

<212> PRT

<213> Rat

<400> 19

Ile Glu Ala Thr Arg Cys Ser Thr Gly Ile Lys Gly Met Asn Lys Ala
 5 10 15
 Gln Val Cys Gln Gly Gly Ser Cys Ile Thr Arg Asn Cys Arg Arg Asn
 20 25 30
 Ser Thr Thr Gln Leu Tyr Glu Lys Asp Cys Gln Phe Phe Pro Asp Lys
 35 40 45
 Val Gln Thr Glu Lys Ser Ser Ile Met Phe Met Gln Ser Ile Asp Ser
 50 55 60
 Val Thr Glu Phe Cys Lys Lys Glu Asn His Asn Arg Glu Ala Pro Thr
 65 70 75 80
 Leu His Asn Gln Lys Cys Asp Tyr Arg Ser Thr Trp Glu Val Ile Ser
 85 90 95
 Asn Ser Glu Asp Phe Lys Asn Ser Thr Pro Met Glu Met Pro Pro Ser
 100 105 110
 Pro Pro Phe Phe Ser Leu Leu Arg Ile Ser Glu Arg Ile Val Cys Leu
 115 120 125
 Val Leu Asp Val Ser Gly Ser Met Gly Ser Tyr Asp Arg Leu Asn Arg
 130 135 140
 Met Asn Gln Ala Ala Lys Phe Phe Leu Gln Gln Ile Leu Glu Ser Arg
 145 150 155 160
 Ser Trp Ala Gly Met Val His Phe His Ser Ser Ala Thr Val Lys Ser
 165 170 175
 Glu Leu Ile Gln Ile Asn Ser Asp Val Glu Arg Asn Gln Leu Leu Glu
 180 185 190
 Thr Leu Pro Thr Ser Ala Ser Gly Gly Thr Ser Ile Cys Ser Gly Ile
 195 200 205
 Arg Thr Ala Phe Gln Val Phe Lys Asn Lys Gly Tyr Gln Thr Gly Gly
 210 215 220

85

86

Asn Asp Ile Leu Leu Leu Ser Asp Gly Glu Asp Ser Thr Ala Lys Asp
 225 230 235 240
 Cys Leu Asp Glu Val Lys Asp Ser Gly Ala Val Val His Phe Ile Ala
 245 250 255
 Leu Gly Lys Ala Phe Asp Gln Ser Ile Ser Asn Met Ala Asn Val Thr
 260 265 270
 Gly Gly Lys Gln Leu Phe Ala Thr Asp Glu Ala Gln Asn Asn Gly Leu
 275 280 285
 Ile Asp Ala Phe Gly Ala Leu Ala Ser Glu Asn Ala Asp Val Thr Glu
 290 295 300
 Lys Ser Leu Gln Leu Glu Ser Lys Gly Ala Val Leu Thr Asn Ser Arg
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Asp Thr Val Val Ile Asp Ser Thr Val Gly Lys Asp Thr
 325 330 335
 Tyr Phe Leu Val Thr Trp Ser Gln Gln Ala Pro Ala Ile His Leu Arg
 340 345 350
 Asp Pro Lys Gly Thr Gln Ile Thr Asn Phe Thr Ile Asp Thr Ala Ser
 355 360 365
 Lys Met Ala Tyr Leu
 370

<210> 20

<211> 1119

<212> DNA

<213> Rat

<400> 20

atcgaagcaa caaggtgttc cacaggtatc aagggtatga ataaagccca ggtatgccaa 60
 gggggcagct gtataaccag aaattgcaga cggaattcca ccacacagtt atatgaaaaa 120
 gattgtcagt tcttcccgga taaagttcaa acagaaaagt catctataat gttcatgcaa 180
 agtatcgatt cagtgtactga attctgtaaa aaagaaaacc ataatcgaga ggctccaact 240
 ctacataatc agaagtgcga ttacagaagc acatgggaag taatcagtaa ttctgaggat 300
 tttaaaaaca gcacacccat ggagatgccca ccctctccac ccttcttctc gctgctgagg 360
 atcagtgaag gaattgtgtg cctagtgtct gatgtgtctg ggagcatggg gtcttatgat 420
 cgcttcaatc gaatgaacca agcagcaaaa ttcttctac agcagatact tgaaagtagg 480
 tcctgggcag ggatggtaca cttcatagc tcggccactg ttaagagtga gctgatccaa 540
 ataaacagtg atgtcgagag aaaccagctt ttggaaacct tacctacaag tgctagcgga 600
 gggacatcca tctgctctgg aatcagaact gcatttcagg tatttaaaaa taaaggatac 660
 caaactgggtg ggaatgacat cttgctgttg agcgatgggg aggacagcac agccaaagac 720
 tgcccttgatg aggtgaaaga cagcggggcc gtagttcatt tcattgcctt gggaaaagca 780
 tttgatcaat ctatatcaaa catggccaac gtaacagggtg gaaagcaact gtttcttaca 840
 gatgaagccc agaacaatgg actcattgat gctttcgggg ccctggcttc agaaaatgct 900
 gatgtcactg agaagtcctt tcagcttgaa agcaagggtg ctgtgttgac caacagtcgc 960
 tggtgaacg acactgtcgt tattgacagc accgtgggaa aggacacata ctttcttctc 1020
 acctggagcc aacaagcccc tgccattcat ctgaggatc ccaaaggaa acaataaca 1080
 aatttcacaa tcgacacggc ttccaaaatg gcctatctc 1119

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer
 <400> 21
 tgcctttcaa aatgttggtg 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 22
 aaaatcgaag caacaaggtg 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 23
 gagataggcc attttgaag 20
 <210> 24
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 24
 aagcccagaa caatggac 18

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード (参考)

A 6 1 P 1/00
 1/04
 11/00
 11/02
 11/06
 C 0 7 K 14/47
 16/18
 C 1 2 N 1/15
 1/19
 1/21
 5/10
 C 1 2 P 21/02
 C 1 2 Q 1/68
 G 0 1 N 33/15
 33/50

A 6 1 P 1/04
 11/00
 11/02
 11/06
 C 0 7 K 14/47
 16/18
 C 1 2 N 1/15
 1/19
 1/21
 C 1 2 P 21/02
 C 1 2 Q 1/68
 G 0 1 N 33/15
 33/50
 C 1 2 N 15/00
 5/00

C
 A
 Z
 Z
 Z N A A
 A

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36
FB02 FB05 FB12 GC15
4B024 AA01 AA11 BA58 BA80 CA04
CA12 DA01 DA02 DA05 DA06
DA11 EA04 GA01 GA11 HA08
HA11
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ42 QQ53
QQ61 QR08 QR32 QR42 QR56
QR62 QS28 QS32 QS34
4B064 AG01 AG26 CA02 CA05 CA10
CA11 CA19 CA20 CC24 DA01
DA13
4B065 AA01X AA57X AA87X AA91Y
AB01 AB02 CA24 CA44
4C084 AA07 AA13 AA17 NA14 ZA34
ZA59 ZA66 ZB11
4C085 AA13 AA14 BB11 EE01 GG01
GG08
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09
CA40 DA75 EA20 EA50 FA74